

Biophysik 7, 146-151 (1971)  
© by Springer-Verlag 1971

~~A 1007~~  
CR \_\_\_\_\_

# Ein Vergleich der Wirkung von ionisierender Strahlung auf peptidgebundene und freie Aminosäuren in festem Zustand

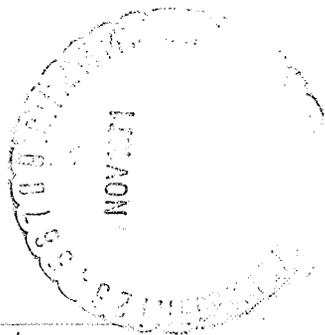
K. DOSE und M. C. BRAND

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt (Main)

Eingegangen am 28. September 1970

RECEIVED  
A.I.A.A.  
71 OCT - 1 PM 1:04  
T. I. S. LIBRARY

33 MP1



N71 - 75990

FACILITY FORM 602

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| (ACCESSION NUMBER)            | (THRU)     |
| 7                             | none       |
| (PAGES)                       | (CODE)     |
| CR-125206                     |            |
| (NASA CR OR TMX OR AD NUMBER) | (CATEGORY) |

*A Comparison of the Effect of Ionizing Radiation on Peptide-Bound and Free Amino Acids in the Solid State*

*Summary.* Irradiation of thermal polymers of  $\alpha$ -amino acids with X-rays in the solid state produces a significantly increased destruction of tryptophan, histidine, cystine, lysine and methionine as compared with the response of constituent amino acids in proteins. These results are discussed with respect to related results obtained by irradiation of dry films of amino acid mixtures which indicate an even stronger energy or charge transfer towards the four amino acids mentioned. The results are also discussed with respect to the radiation sensitivity of constituent amino acids in proteins and the inactivation of enzymes.

*Zusammenfassung.* Untersuchungen an thermischen Polymeren von  $\alpha$ -Aminosäuren in festem Zustand zeigen, daß in diesen insbesondere Tryptophan, Histidin, Cystin, Lysin und Methionin eine höhere Strahlenempfindlichkeit als in den bisher untersuchten Proteinen aufweisen. Diese Ergebnisse werden verglichen mit ähnlichen Untersuchungen an Filmen von Aminosäuremischungen, die in noch stärkerem Umfang auf einen beträchtlichen Energietransfer oder Chargetransfer in Richtung auf die vier genannten Aminosäuren schließen lassen. Die Ergebnisse werden auch in Hinsicht auf die Strahlenempfindlichkeit von Aminosäuren in Proteinen und auf die Inaktivierung von Enzymen diskutiert.

### Einleitung

Über die Mechanismen, durch welche freie und peptid- bzw. proteingebundene Aminosäuren durch ionisierende Strahlung zerstört und Enzyme im festen Zustand inaktiviert werden, gibt es in der Literatur verschiedene kontroverse Darstellungen. 1960 berichteten Alexander u. Hamilton [1] über die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung von kristallisiertem Rinderserumalbumin nach Bestrahlung mit 2 MeV-Elektronen. Aus den Ergebnissen konnte man den Schluß ziehen, daß die Strahlenempfindlichkeit der proteingebundenen Aminosäuren in erster Näherung von Milieufaktoren unabhängig ist. Eine spezifische Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit einzelner proteingebundener Aminosäuren zugunsten des Schutzes anderer Aminosäuren wurde nicht gefunden. Diese Ergebnisse schließen daher eine wesentliche Beteiligung von Energietransferprozessen aus. Zu ähnlichen Ergebnissen und Schlußfolgerungen kamen 1966 Dose et al. [4] auf Grund ihrer Untersuchungen mit röntgenbestrahltem Lysozym.  $G$ -Werte zwischen  $-7$  und  $-13$  wurden für die Zerstörung von Histidin, Cystin, Methionin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, aber auch Valin, Leucin und Isoleucin gefunden. Die  $G$ -Werte für die Zerstörung der meisten anderen Aminosäuren lagen zwischen  $-4$  und  $-7$ . Für Glycin beträgt der  $G$ -Wert  $-3$ , während für Alanin sogar eine

Zunahme ( $G$ -Wert + 7) festgestellt wurde. Diese beiden Aminosäuren sind jedoch zugleich Radiolyseprodukte der übrigen Aminosäuren. Die Ergebnisse über die radiolytische Zerstörung der Aminosäuren des kristallisierten Lysozyms wurden kürzlich von Tolbert eingehend bestätigt [12, 13, 14]. Mit diesen Ergebnissen ( $G$ -Werte für die Zerstörung der einzelnen Aminosäuren etwa von der gleichen Größenordnung; Strahlenempfindlichkeit der Aminosäuren in erster Näherung unabhängig von der Art ihrer Bindung) stimmt auch die Studie von Bowes u. Moss [2] über die Wirkung von  $\gamma$ -Strahlung auf Kollagen überein, obwohl in dieser Arbeit weder Dosis-Effektkurven noch sorgfältigere Fehleranalysen beschrieben werden. Wegen der geringen relativen Veränderung der Aminosäurezusammensetzung der Proteine nach Bestrahlung mit selbst 100 Mrad ist aber eine fehlertheoretische Diskussion der Ergebnisse unumgänglich.

Das hier skizzierte Konzept über die Strahlenempfindlichkeit von Aminosäuren innerhalb und außerhalb von Proteinen schien kürzlich durch eine Arbeit von Burke u. Augenstein [3] erschüttert zu werden. Diese Autoren berichteten, daß sich die Aminosäurezusammensetzung von trockenem Trypsin durch Bestrahlung mit Dosen, die fast die gesamte enzymatische Aktivität zerstören (bis zu 80 Mrad pro MeV Elektronen oder  $\gamma$ -Strahlen) praktisch nicht meßbar verändert, während durch die gleiche Strahlendosis Cystin, Tryptophan, Histidin und Methionin in zu Filmen aggregierten Gemischen der freien Aminosäuren mit bemerkenswerter Ausbeute und Selektivität zerstört werden. Nach genauer Auswertung der von Burke u. Augenstein publizierten quantitativen Ergebnisse über Aminosäureveränderungen im bestrahlten Trypsin fanden wir jedoch, daß die relative Abnahme der einzelnen Aminosäurereste nach Bestrahlung mit 80 Mrad (1 MeV Elektronen) tatsächlich durchschnittlich kaum mehr als 5% erreicht. Dieser Wert ist aber durchaus vergleichbar mit der von uns für 100 Mrad (Röntgenstrahlen) gefundenen durchschnittlichen Zerstörung von etwas mehr als 6% der Aminosäuren im Lysozym. Weiterhin findet man, daß sowohl im Trypsin als auch im Lysozym dieselben Aminosäuren (Cystin, Tryptophan etc.) mit geringfügig erhöhter Selektivität zerstört werden. Für die Bestrahlung des trockenen Trypsins mit Dosen bis zu 50 Mrad ( $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -Strahlen) konnten Burke u. Augenstein, außer im Fall des Cystins, keine signifikante Abnahme von Aminosäuren feststellen. Dieses liegt jedoch nach unserer Erfahrung eindeutig daran, daß die Empfindlichkeit der Aminosäureanalyse für diese Dosen eine sichere Erfassung von Effekten nicht mehr gestattet.

Wir können Burke u. Augenstein daher nicht in ihrer Annahme zustimmen, daß die Inaktivierung des Trypsins in beiden Fällen weniger auf die Zerstörung von Aminosäureresten als auf die Änderung der „internen Organisation“ des Enzyms zurückzuführen sei. Nimmt man nämlich an, daß ein Enzym bei der Zerstörung einer Aminosäure des aktiven Bereichs inaktiviert wird, so gilt folgende Beziehung:

$$G_E \simeq \sum_i \alpha_i \frac{n_i \cdot M_i}{M_E} G_i, \quad (1)$$

wobei  $G_E$  der  $G$ -Wert für die Inaktivierung,  $\alpha_i$  die Fraktion von  $n_i$  Aminosäuren der Sorte  $i$  im aktiven Bereich,  $M_i$  das Molekulargewicht der Aminosäure  $i$ ,  $M_E$  das Molekulargewicht des Proteins und  $G_i$  der scheinbare  $G$ -Wert [vgl. Gl. (3)] für die Zerstörung der Aminosäure  $i$  ist. Als erste Näherung gilt

$$G_E \approx \bar{\alpha}_i \cdot \bar{G}_i, \quad (2)$$

wobei  $\bar{\alpha}_i$  ein von Protein zu Protein verschiedener Durchschnittswert ist, während für  $\bar{G}_i$  aufgrund der bisherigen Ergebnisse [1, 4, 12—14] in erster Näherung ein Zahlenwert von etwa 6 benutzt werden kann. Im Fall des Trypsins gehören etwa 25% der Aminosäuren zum aktiven Bereich, d. h.  $\bar{\alpha}_i \approx 0,25$ .  $G_E$  ist gemäß Gl. (2) daher etwa 1,5. Die experimentell gefundenen G-Werte für die Inaktivierung des Trypsins [3, 5] stimmen mit diesem Wert überein. Dieses Ergebnis bestätigt, daß die Zerstörung der Aminosäurereste, auch wenn sie analytisch kaum erfaßt werden kann, von signifikanter Bedeutung für die Inaktivierung des kristallisierten Trypsins ist. Es soll dabei nicht ausgeschlossen werden, daß strahlungsinduzierte Konformationsänderungen des Enzyms — unabhängig oder abhängig von der Zerstörung der Aminosäuren — gleichfalls zu einer Inaktivierung führen können. Weiterhin sei nochmals betont, daß die obige Annahme von Durchschnittswerten für die einzelnen Aminosäuren nur als erste Näherung gilt und nicht beinhaltet, daß spezielle Akte besonderer Effektivität auszuschließen sind.

Reihen sich daher unserer Ansicht nach die von Burke u. Augenstein gefundenen Ergebnisse über die Inaktivierung und die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung auch im Fall des Trypsins gut in die bisher bekannten Ergebnisse ein, so ergeben sich doch beim Vergleich mit den zu Filmen aggregierten freien Aminosäuren erhebliche Besonderheiten und deutliche Anzeichen eines intensiven Energietransfers auf Cystin, Methionin, Tryptophan und Histidin. Es stellte sich nunmehr die Frage, ob dieser Effekt charakteristisch ist für den Zustand und die relativ ungeordnete Orientierung von freien Aminosäuren in Filmen, oder ob er auch für bestimmte Polymere von Aminosäuren beobachtet werden kann; insbesondere, wenn bei diesen Polymeren vom Ordnungsprinzip der linearen  $\alpha$ -peptidischen Verknüpfung abgewichen wird (z. B. durch Verknüpfung der  $\gamma$ -Carboxylgruppen der Glutaminsäure oder der  $\varepsilon$ -Aminogruppen des Lysins). Derartige, nichtlineare Polymere lassen sich z. B. durch Erhitzen von Aminosäuren über den Siedepunkt des Wassers herstellen [7]. In bezug auf ihre Verwandtschaft zu den Proteinen werden sie Proteinoide genannt. Wegen der Möglichkeit ihrer Bildung unter geochemischen Bedingungen, insbesondere der primitiven Erde, sind Proteinoide wiederholt als „Urprotein“ diskutiert und untersucht worden.

### Material und Methoden

*Synthese der thermischen Polymeren von Aminosäuren (Proteinoide)* s. Dose, K., Brand, M. C.: Biophysik 7, 140—145 (1971).

*Bestrahlungsbedingungen.* Die Bestrahlungen wurden anaerob (Stickstoff) und unter Wasserkühlung vorgenommen; die Bestrahlungsgefäße aus V4a-Stahl waren mit einer 22  $\mu$  dicken „Hostaphan“-Folie bedeckt.

Die Dosisleistung der Hochspannungsröhre [9, 11] betrug 1,2 Mrad/min bei einer Röhrenspannung von 70 kV.

Die Proteinoide trocknete man im Vakuumexsiccator über Blaugel und bestrahlte im trockenen Zustand mit einer Dosis von 100 Mrad. Lysozym und die Proteinoide wurden in der Konzentration von 1 mg/ml in 0,02 *m* Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst und bestrahlt, die Dosis betrug 0,5 und 1 Mrad.

*Aminosäureanalyse* s. Dose, K., Brand, M. C.: Biophysik 7, 140—145 (1971).

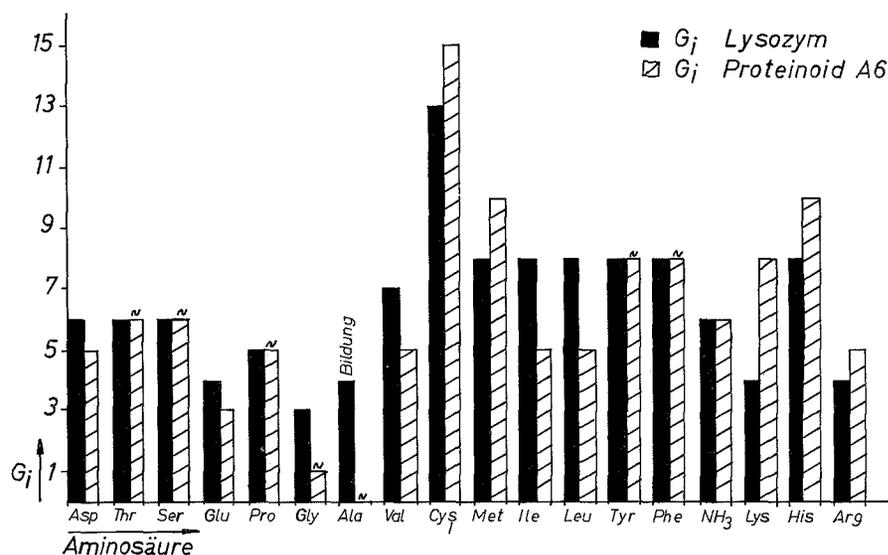


Abb. 1.  $G$ -Werte für die Zerstörung von Aminosäuren bei Röntgenbestrahlung von Lysozym und Proteinoid A6 im festen Zustand:

$$G_i = \frac{G \cdot 100}{\text{g-\% Aminosäure im Protein(oid)}}$$

### Ergebnisse und Diskussion

Die Aminosäurezusammensetzung des Lysozyms, des Trypsins sowie einiger weiterer Proteine und der synthetischen Polymere A6, W2f und CG179 ist in Tabelle 1 der vorstehenden Arbeit wiedergegeben (K. Dose u. M. C. Brand, S. 142). Die  $G$ -Werte für die Zerstörung der Aminosäuren des im trockenen Zustand mit Dosen von etwa 100 Mrad bestrahlten Lysozyms und Polymers A6 sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Die angegebenen  $G$ -Werte sind scheinbare  $G$ -Werte. Sie geben die Zahl der veränderten Aminosäuren der Sorte  $i$  pro 100 eV der von den Aminosäuren derselben Sorte  $i$  absorbierten Energie an. Aus dem wahren  $G$ -Wert lassen sich scheinbare  $G$ -Werte durch die Beziehung

$$G_i = \frac{G \cdot 100}{\text{g-\% Aminosäure im Protein}} \quad (3)$$

errechnen. Die scheinbaren  $G$ -Werte der proteingebundenen Aminosäuren können unmittelbar mit den  $G$ -Werten für die Bestrahlung freier Aminosäurereste verglichen werden.

Die in Abb. 1 zusammengefaßten Werte zeigen im Falle des nichtlinearen Polymers A6 für die Zerstörung des Cystins, Methionins, Histidins und Lysins wesentlich höhere  $G$ -Werte sowie für Arginin leicht erhöhte  $G$ -Werte gegenüber der Beobachtung an Proteinen. Besonders drastisch ist die Zerstörung der Tryptophanreste. Sie beträgt z. B. für Polymer W2f über 60% nach Bestrahlung mit etwa 45 Mrad. Wegen dieser starken Abnahme des Tryptophans können  $G$ -Werte (als

initiale Werte) für diese Versuche nicht mehr berechnet werden. Die initialen  $G$ -Werte dürften hier schätzungsweise größer als 30 (!) sein.

Diese extremen Ergebnisse hielten wir für Artefakte, bis wir von den außerordentlich ähnlichen Ergebnissen von Burke u. Augenstein [3] für die Bestrahlung hochdisperser Gemische freier Aminosäuren, die in Form dünner Filme vorlagen, Kenntnis erhielten. Unter diesen Bedingungen ist anscheinend ebenso wie in den nichtlinearen Polymeren der Aminosäuren — wenn auch abgeschwächt — ein intensiver Energie- oder Chargetransfer in Richtung auf Tryptophan, Lysin, Histidin, Cystin, Methionin sowie teilweise auch Arginin begünstigt. Für diese Ansicht sprechen insbesondere die an sich sonst zu hohen  $G$ -Werte für die Zerstörung des Tryptophans, denen andererseits erniedrigte  $G$ -Werte für die Zerstörung der Asparagin- und Glutaminsäure, des Valins, Leucins und Isoleucins gegenüberstehen. Dieser sehr intensive Energie- oder Chargetransfer ist offenbar im Fall der (biologischen)  $\alpha$ -peptidischen Verknüpfung nicht begünstigt. Diese Folgerung scheint im Widerspruch zu älteren Theorien über die Energiefortleitung in Peptidketten nach Einwirkung optischer Strahlung zu stehen, denn für diese Theorien spielt die nur bei der  $\alpha$ -Verknüpfung mögliche Orientierung der Peptidkette zur  $\alpha$ -Helix eine wichtige Rolle [10]. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß bei der Einwirkung von ionisierender Strahlung auf Proteine andere Energieleitungsmechanismen im Vordergrund stehen als bei Einwirkung optischer Strahlungen.

ESR-Untersuchungen haben bereits gezeigt, daß ein recht wirkungsvoller intermolekularer Chargetransfer zwischen freien Aminosäuren auftreten kann. Bei diesem Prozeß scheinen die vier an erster Stelle genannten Aminosäuren Cystin, Tryptophan, Histidin und Methionin gleichfalls die bevorzugten Elektronenakzeptoren darzustellen. Tatsächlich beobachtete man auch diese Effekte nur für Präparate, die durch Eintrocknen von Aminosäurelösungen hergestellt wurden [8]. Es ist wahrscheinlich, daß sich die Aminosäuren während dieser Prozedur weitgehend in ähnlicher Weise orientieren wie bei der genannten thermischen Synthese von nichtlinearen Polyaminosäuren. Der erwähnte Energietransfer tritt in mechanisch hergestellten Aminosäuremischungen nicht auf, auch wenn die mechanische Durchmischung noch so intensiv ist.

Unsere Ergebnisse zeigen somit 1., daß im Hinblick auf ihr strahlenchemisches Verhalten zumindest die drei von uns untersuchten, sehr unterschiedlichen thermischen Polymeren von Aminosäuren eine Stellung zwischen dem Verhalten von Proteinen und filmartig aggregierten Aminosäuremischungen einnehmen, 2., daß unter bestimmten Bedingungen zwischen Aminosäuren ein intensiver Energietransfer oder Chargetransfer auftreten kann und 3., daß die räumliche Orientierung und spezifische  $\alpha$ -Peptidverknüpfung in nativen Proteinen für einen intensiven Energietransfer oder Chargetransfer in Richtung auf die vier auch sonst als empfindlich bekannten Aminosäuren ungünstig zu sein scheint.

Wir danken Herrn Dr. S. Risi für die Durchführung einiger Aminosäureanalysen. Vergleichspräparate mit Aminosäurezusammensetzung entsprechend den Proteinoiden CG 179 und W 2f wurden zuerst im Institut of Molecular Evolution, University of Miami, Fla. (Dr. S. W. Fox) hergestellt. Diese Arbeiten wurden teilweise unterstützt durch Grant NsG-689 der National Aeronautics and Space Administration.

## Literatur

1. Alexander, P., Hamilton, L. D. H.: Irradiation of proteins in the solid state. *Radiat. Res.* **13**, 214 (1960).
2. Bowes, J. H., Moss, J. A.: The effect of  $\gamma$ -radiation on collagen. *British Leather Manufacturers Research Association Laboratory, Reports XL*, No. 1, p. 1—14 (1961).
3. Burke, M., Augenstein, L.: A comparison of the effects of ultraviolet and ionizing radiations on trypsin activity and on its constituent amino acids. *Biochem. J.* **114**, 535 (1969).
4. Dose, K., Risi, S., Rauchfuß, H.: Veränderungen von Aminosäuren und Aktivität bei Röntgenbestrahlung von kristallisiertem Lysozym. *Biophysik* **3**, 202 (1966).
5. — Korrelation zwischen Inaktivierung und Bruch von Disulfidbrücken bei der Bestrahlung von Proteinen. In: *Molekulare Struktur und Strahlenwirkung, Tagungsbericht der Jahrestagung der dtsh. Ges. f. Biophysik, Juni 1966* (Glubrecht, H., Ernst, D., Hinsch, H., Knälmann, M., Scheuermann, W., Siebert, W., Hrsg.). Stuttgart: Thieme 1968.
6. — Brand, M. C.: Zur Abhängigkeit der Photosensibilität von Aminosäuren von Umgebungsfaktoren. *Biophysik* **7**, 140—145 (1971).
7. Fox, S. W.: Natural polymers (abiotic polymerization and self-organization). *Encyclopedia Polymer Sci. Technol.* **9**, 284 (1968).
8. Gordy, W., Miyagawa, I.: Electron spin resonance studies of mechanisms for chemical protection from ionizing radiation. *Radiat. Res.* **12**, 211 (1960).
9. Heuse, O.: Eine 65-KW-Röntgenanlage für strahlenbiologische Untersuchungen. *Z. angew. Phys.* **5**, 361 (1953).
10. Lautsch, W., Broser, W., Höfling, E., Gnichtel, H., Schröder, E., Krüger, R., Woldt, J., Schulz, G., Wiechert, R., Bandel, W., Kurth, G., Kraege, H.-J., Gehrman, W., Prater, K., Parsiegla, G., Pasedag, R., und Hunger, W.: Über Fermentmodelle der Atmungskette (1). *Kolloid-Zeitschrift* **144**, 82 (1955).
11. Rajewsky, B.: Aus der Werkstatt der biophysikalischen Forschung. In: *Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft 1952*, S. 102—143. Hrsg. von der Generalverwaltung der MPG, München 1952.
12. Stevens, C. O., Tolbert, B. M., Reese, F. E.: Radiation chemistry of proteins. I. Modified lysozyme substances. *Arch. Biochem.* **102**, 423 (1963).
13. — Henderson, L. E., Tolbert, B. M.: Radiation chemistry of proteins. II. Enzymic activity and deuterium exchange properties of lysozyme and  $\alpha$ -chymotrypsin. *Arch. Biochem.* **107**, 367 (1964).
14. Tolbert, B. M., Marciani, D. W., Herbert, S. M.: Macromolecular properties of purified proteins from irradiated solid lysozyme. *IVth International Congress of Radiation Research 1970*, Abstract 860 (1970).

Prof. Dr. K. Dose  
Max-Planck-Institut für Biophysik  
BRD-6000 Frankfurt 70  
Kennedyallee 70  
(Deutschland)